



REC'D 26 SEP 2000
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

FR 00/02174

E5U

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

10/048209

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le ..... **22 AOUT 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>30 JUIL 1999</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>9909 29</b>		CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>75 INPI PARIS</b>		n° du pouvoir permanent      références du correspondant <b>BLOcb644/45FR</b>	
DATE DE DÉPÔT <b>30 JUIL 1999</b>		téléphone	
<b>2 DEMANDE</b> Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen     demande initiale <input type="checkbox"/> différencié <input checked="" type="checkbox"/> immédiat <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° <small>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance</small> <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
<b>Établissement du rapport de recherche</b> <small>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</small> <b>NOUVELLES APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE</b>			
<b>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN</b> <small>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</small> <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)</b>		<small>code APE-NAF</small> <small>Forme juridique</small> <b>Etablissement public</b>	
<small>Nationalité (s)</small> <b>Française</b> <small>Adresse (s) complète (s)</small> <b>3, rue Michel-Ange 75794 PARIS CEDEX 16</b> <small>Pays</small> <b>FRANCE</b>			
<small>En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre</small> <input type="checkbox"/> <b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non    Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
<b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
<b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE</b> <small>pays d'origine</small> <small>numéro</small> <small>date de dépôt</small> <small>nature de la demande</small>			
<b>7 DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande <small>n°</small> <small>date</small> <small>n°</small> <small>date</small>			
<b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <small>(nom et qualité du signataire)</small> 		<small>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</small> <small>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</small> 	
<b>Béatrice ORES (n° 92-4046)</b>			



INSTITUT  
NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

990 9929

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVELLES APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE  
CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
75008 PARIS

DÉSIGNÉ(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- ALLINQUANT Bernadette  
7, rue Edouard Manet  
75013 PARIS, FRANCE
- PROCHIANTZ Alain  
8, rue Marie Pape-Carpentier  
75006 PARIS, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) ~~DU 30 JUILLET 1999~~ du mandataire

Paris, le 30 juillet 1999

*B. Ores*

Béatrice ORES (n° 92-4046)

**DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
M. diffié (s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 3				24.02.00	29 FEV. 2000 - VD
p. 5, 10			X	24.02.00	29 FEV. 2000 - VD
p. 11, 12, 13				24.02.00	29 FEV. 2000 - VD

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

La présente invention est relative à de nouvelles applications de peptides issus du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP).

Le précurseur de la protéine amyloïde  $\beta$ APP est une protéine de fonction inconnue, dont la forme neuronale comporte 695 acides aminés ; elle présente un seul domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique de 47 acides aminés, représenté dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO :1.

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif qui affecte de 1 à 6 % de la population âgée de plus de 65 ans. L'une de ses caractéristiques est la présence de plaques séniles qui contiennent du  $\beta$ -amyloïde ( $\beta$ A4), produit toxique dérivé du  $\beta$ APP et constitué de peptides de 39 à 42 acides aminés, engendrés par clivage du  $\beta$ APP par deux protéases la  $\beta$  et la  $\gamma$  sécrétase. Par ailleurs, une troisième enzyme, dite  $\alpha$  sécrétase clive le  $\beta$ APP entre les sites  $\beta$  et  $\gamma$  rendant donc impossible la formation du  $\beta$ A4 supposé pathogène. Aucune de ces sécrétases n'a été identifiée à ce jour, même si des suspicitions légitimes pèsent sur la protéine PS1 (produit du gène Presenilin-1, muté dans des formes familiales de la maladie d'Alzheimer). En effet, PS1 pourrait être soit la  $\gamma$  sécrétase soit un de ses co-facteurs. Enfin, d'autres sites de clivage existent dans le domaine C-terminal dont le site des caspases (N. Barnes et al., J. Neuroscience, 1998, 18, 15, 5869-5880), entre les résidus aspartate et alanine de la SEQ ID NO:1 (positions 15 et 16). Il reste que les mécanismes responsables de la toxicité du  $\beta$ A4 ne sont pas connus et que la relation entre la présence du  $\beta$ A4 dans les plaques et la pathologie n'est pas élucidée. Il est probable que d'autres facteurs et/ou d'autres domaines de la molécule entrent également en jeu.

C'est la raison pour laquelle de nombreuses études ont essayé d'établir le rôle physiologique et/ou physiopathologique du  $\beta$ APP et des différents produits de son métabolisme. En effet, le ligand physiologique – s'il existe – du domaine N-terminal n'a pas été identifié et les voies de signalisation sont encore mal définies. Une des stratégies d'accès à l'analyse de ces voies de signalisation est l'identification de partenaires moléculaires du domaine cytoplasmique.

Le domaine cytoplasmique du  $\beta$ APP ainsi que différents peptides issus de ce domaine cytoplasmique ont en particulier été étudiés :

- les séquences YTSI, KKKQYTSIHHGVVEV (SEQ ID NO :8), GYENPTY (SEQ ID NO :9) et NPTY ont été identifiées comme des signaux d'internalisation ; de manière plus précise, elles sont considérées comme des séquences de transcytose du  $\beta$ APP entre les compartiments basolatéral et apical des 5 cellules épithéliales MDCK (Haass et al., J. Cell Biol., 1995, 128, 4, 537-547 ; Lai et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 8, 3565-3573 ; Lai et al., J. Biol. Chem., 1998, 273, 6, 3732-3739) ;

- le domaine cytoplasmique C-terminal (APP-Cter) a été identifié comme :

10 . intervenant dans la régulation de l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$ o de la protéine G hétérotrimérique (Brouillet et al., J. Neuroscience, 1999, 19, 5, 1717-1727) ;

15 . interagissant avec plusieurs protéines : Pat-1 interagit avec le domaine juxtamembranaire (KKKQYTSIHHG) et avec le domaine C-terminal complet et interviendrait dans le transport d'APP le long des microtubules, vers la surface cellulaire (Zheng et al., PNAS, 1998, 95, 14745-14750) ; la sous-unité  $\alpha$ o de la protéine G hétérotrimérique interagit avec la région médiane dudit domaine cytoplasmique C-terminal, au niveau du double d'histidines (HH) (Nishimoto et al., Nature, 1993, 362, 75-79) et la protéine Fe65 avec la région la plus distale du domaine 20 APP-Cter (Fiore et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 52, 30853-30856).

Ces différents résultats montrent la complexité des mécanismes dans lesquels le précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP) est impliquée.

Les Inventeurs ont maintenant montré, que de manière surprenante, des peptides comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP), présentent, après internalisation dans des cellules, une activité apoptotique.

La présente invention a pour objet des peptides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des séquences incluant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP) (code une 30 lettre), sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences  $Y_1KQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :2),  $Y_1KKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :3) et  $Y_1KKKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :4), dans lesquelles  $Y_0$  est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou

VVEVD et Y<sub>1</sub> représente un peptide d'internalisation et d'adressage issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés et répond de préférence à la séquence X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>, dans laquelle X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent 5 chacun un acide α-aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X<sub>6</sub> représentant un tryptophane.

Parmi les séquences Y<sub>1</sub> préférées, on peut citer la séquence KQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:5).

Les peptides X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub> ont 10 notamment été décrits dans la Demande Internationale WO 97/12912.

Les peptides selon l'invention provoquent l'apoptose des cellules dans lesquelles ils sont internalisés et peuvent avantageusement être utilisés pour sélectionner et cibler des produits aptes à inhiber l'apoptose cellulaire.

La présente invention a donc également pour objet l'utilisation d'un 15 peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (βAPP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

Conformément à ladite utilisation, ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre) Y<sub>1</sub>KQYTSIHHGY<sub>0</sub> (SEQ ID 20 NO:2), Y<sub>1</sub>KKQYTSIHHGY<sub>0</sub> (SEQ ID NO:3) et Y<sub>1</sub>KKKQYTSIHHGY<sub>0</sub> (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y<sub>0</sub> est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y<sub>1</sub> est nul ou représente un peptide d'internalisation et d'adressage issu de la 3<sup>ème</sup> hélice 25 des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés et répond de préférence à la séquence X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>, dans laquelle X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent chacun un acide α-aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X<sub>6</sub> représentant un tryptophane.

Le peptide de SEQ ID NO:2 dans laquelle Y<sub>1</sub> est nul et Y<sub>0</sub> est nul est dénommé peptide G (voir également figure 1).

La présente invention a également pour objet l'utilisation de 30 cellules, dans lesquelles un peptide tel que défini ci-dessus a été internalisé, pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage et de sélection de produits aptes à inhiber l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'inhibiteur potentiel avec une cellule dans  
5 laquelle un peptide tel que défini ci-dessus a été internalisé et  
- la mesure du clivage de l'ADN ou de l'actine.

La présente invention a en outre pour objet l'utilisation d'un peptide tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un médicament anti-cancéreux.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des figures annexées dans  
10 lesquelles :

- la figure 1 représente la séquence du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP),

- la figure 2 représente la quantification du clivage de l'ADN par la technique tunel 24 h après internalisation des peptides,

15 - la figure 3 représente la quantification du clivage de l'actine par la caspase 3 à l'aide de l'anticorps anti-fractine,

- la figure 4 représente l'image confocale d'un neurone après 24 h d'internalisation du peptide G (concentration IX) montrant dans le même plan le clivage de l'actine par la caspase 3 (révélé par un anticorps anti-fractin) et le clivage de l'ADN (révélé par le marquage tunel).

**EXEMPLE :**

- Préparation des peptides

On utilise le vecteur V1 (Penetratine = KQIKIWFQNRRMKWKK)  
(SEQ ID NO:5) comme peptide d'internalisation qui, après fusion génétique ou  
25 chimique à un cargo, permet sa translocation à travers la membrane plasmique et son adressage cytoplasmique et nucléaire.

Plusieurs peptides ont ainsi été préparés :

. SEQ ID NO:5 + domaine cytoplasmique entier du  $\beta$ APP (SEQ ID NO :1).

30 .  $Y_1$ KKKQYTSIHHGY $_0$  : SEQ ID NO :4 dans laquelle  $Y_0$  est nul et  $Y_1$  représente la SEQ ID NO:5 ; la partie en gras correspond au peptide G de la figure 1 (=SEQ ID NO :4 dans laquelle  $Y_0$  est nul et  $Y_1$  est nul).

. Y<sub>1</sub>KQYTSIHHGY<sub>0</sub> : SEQ ID NO :2 dans laquelle Y<sub>0</sub> est nul et Y<sub>1</sub> représente la SEQ ID NO:5 ; la partie en gras correspond au peptide G de la figure 1 (=SEQ ID NO :2 dans laquelle Y<sub>0</sub> est nul et Y<sub>1</sub> est nul).

5 . Y<sub>1</sub>KKQYTSIHHGY<sub>0</sub> : SEQ ID NO :3 dans laquelle Y<sub>0</sub> est nul et Y<sub>1</sub> représente la SEQ ID NO:5 ; la partie en gras correspond au peptide G de la figure 1 (= SEQ ID NO :2 dans laquelle Y<sub>0</sub> est nul et Y<sub>1</sub> est nul).

. SEQ ID NO:5 + domaine E (VDAAVTPEE, SEQ ID NO:6), souligné dans la séquence selon la figure 1.

10 . SEQ ID NO:5 + domaine H (NGYENPTYK, SEQ ID NO:7), souligné dans la séquence selon la figure 1.

Notons que, dans la mesure où les 2 derniers acides aminés de la séquence SEQ ID NO :5 sont des lysines (KK), le peptide G (KQYTSIHHG) se trouve artificiellement rallongé de 2 acides aminés.

- Internalisation desdits peptides dans des neurones

15 Les conditions d'internalisation sont les mêmes que celles décrites dans la Demande internationale WO 97/12912.

- Résultats

L'internalisation du domaine C-ter entier (APP-Cter) n'est pas toxique mais a, cependant, un effet négatif sur la croissance neuritique.

20 L'internalisation des peptides E et H est sans effet alors que celle du peptide G, à des concentrations inférieures au µM reproduit les effets du domaine C-terminal intact.

Le résultat le plus intéressant est que le peptide G, à des concentrations de l'ordre de 1 à 1,5 µM entraîne la mort des neurones et que cette mort correspond à un processus apoptotique, donc régulé.

25 Le caractère apoptotique de la mort provoquée par l'internalisation du peptide G est démontré par la fragmentation de l'ADN, mise en évidence par la méthode dite « TUNEL » (figure 2), et par l'activation des caspases (figure 3). L'activation des caspases est démontrée par l'apparition de formes clivées de l'actine et par le blocage de l'apoptose par des inhibiteurs de caspase à large spectre d'activité comme le ZVAD.

La figure 2 illustre la quantification du clivage de l'ADN par la technique tunel 24H après internalisation des peptides. Les peptides ont été internali-

sés à 2 concentrations (1X et 2X) en présence ou en absence du ZVAD, un inhibiteur des caspases 1, 3, 4, 7. Chaque condition a été testée en triplicate. Le pourcentage de cellules positives a été évalué après 24H, par comptage d'environ 1 000 cellules par puits. Le graphe indique une augmentation significative du clivage de l'ADN en 5 présence du peptide G seul (concentration 1X : p<0.0001 ; concentration 2X : p<0.0001) et du peptide Gcasp (KKKQYTSIHHGVVEVD) (SEQ ID NO:4 dans laquelle Y<sub>0</sub> = VVEVD et Y<sub>1</sub> = SEQ ID NO:5) (concentration 1X : p<0.0001). Le ZVAD inhibe cette augmentation du clivage.

La figure 3 illustre la quantification du clivage de l'actine par la 10 caspase 3 à l'aide de l'anticorps anti-fractine, par immunocytochimie après fixation des cellules au paraformaldéhyde (F. Yang et al., Am. J. Pathol., 1998, 152, 2, 379-389). L'anticorps anti-fractine reconnaît spécifiquement l'actine clivée par la caspase 3. Le pourcentage de neurones positifs pour la fractine a été déterminé après 24H d'internalisation des peptides, par comptage d'environ 1 000 cellules par puits en 15 triplicate. En présence des peptides G (KQYTSIHHG = SEQ ID NO :2 dans laquelle Y<sub>1</sub> représente un peptide d'internalisation et d'adressage, tel que défini ci-dessus et Y<sub>0</sub> est nul) (1X et 2X) et Gcasp (KKKQYTSIHHGVVEVD= SEQ ID NO :4 dans laquelle Y<sub>1</sub> représente un peptide d'internalisation et d'adressage, tel que défini ci-dessus et Y<sub>0</sub> VVEVD) (1X), il existe une augmentation significative du clivage par 20 l'actine (G1X : p<0.0003 ; G2X : p<0.0001 ; Gcasp1X : p<0.0001). Le ZVAD seul inhibe tout clivage endogène des neurones par la caspase 3 et inhibe significativement l'augmentation de ce clivage par G1X, G2X et Gcasp1X (G1X/ZVADG1X : p<0.0001 ; G2X/ZVADG2X : p<0.0001 ; Gcasp/ZVADGcasp : p<0.0001), même si l'inhibition n'est pas totale.

25 La figure 4 représente une image confocale d'un neurone après 24 heures d'internalisation du peptide G (concentration 1X) montrant dans le même plan le clivage de l'actine par la caspase (révélé par un anticorps anti-fractin) et le clivage de l'ADN (révélé par le marquage tunel).

Dans la mesure où le peptide G correspond à un signal de transcytose et comprend un résidu tyrosine (Y), le peptide a également été internalisé soit 30 après phosphorylation de cette tyrosine (Y-P) soit après sa substitution par une alanine (Y→A) ou une aspartate (Y→D). Les deux substitutions abolissent totalement les

effets physiologiques de G alors que la phosphorylation les amenuise sans les abolir. Dans la mesure où Y→D mime une phosphorylation on peut proposer comme hypothèse parcimonieuse que la tyrosine est nécessaire, mais que sa phosphorylation ne l'est probablement pas. L'effet intermédiaire de Y-P étant alors explicable par la 5 désphosphorylation du peptide dans la cellule. On ne peut cependant pas exclure que la phosphorylation est nécessaire mais que la substitution Y→D n'est pas suffisante pour la mimer.

Les Inventeurs ont donc bien montré le caractère pro-apoptotique du peptide G internalisé grâce à sa liaison au vecteur V1.

10 Une telle propriété est d'intérêt pour les raisons suivantes :

1. Le domaine C-terminal entier n'est pas pro-apoptotique
2. Il existe un site de clivage par les caspases entre les résidus aspartate (D) et alanine (A) marqués en gras dans la séquence de l'APP-Cter (figure 1).

15 On peut donc émettre l'hypothèse que le clivage entre D et A démasque une séquence KKKQ<sub>Y1</sub>TSIHHGVVEVD (= SEQ ID NO :4 dans laquelle Y<sub>1</sub> est nul est Y<sub>0</sub> représente VVEVD) à activité apoptotique. Ceci est particulièrement important car cela met en évidence un mécanisme impliqué dans la perte neuronale qui accompagne des démences de type Alzheimer.

20 Avoir identifié un peptide dérivé du βAPP correspondant à un domaine, normalement exposé après clivage *in vivo* et capable de provoquer l'entrée des cellules en apoptose, a comme premier avantage de proposer un mécanisme original susceptible d'éclairer certains aspects de la pathologie d'Alzheimer et donc de découvrir des voies thérapeutiques nouvelles (mise au point d'inhibiteurs).

25 Par ailleurs la liaison de la séquence G au vecteur V1 permet de fabriquer un peptide qui, une fois internalisé par les neurones en culture, provoque leur apoptose. Du fait des propriétés de V1, l'entrée se fait dans 100% des cellules quel que soit leur degré de maturation *in vitro* et ces cellules sont normales (cultures primaires).

30 Des applications *in vivo*, avec perfusion du peptide à l'aide de mini-pompes, sont aussi possibles.

A partir de là, ce système constitue un test rapide et simple pour cribler des bibliothèques de produits agissant spécifiquement sur la mort apoptotique induite par ce peptide et inoffensif sur d'autres modèles d'apoptose.

L'identification de telles substances est donc très utile pour la mise  
5 au point de traitements de l'apoptose accompagnant la maladie d'Alzheimer.

## REVENDICATIONS

1°) Peptides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des séquences incluant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP) (code une lettre), sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences  $Y_1KQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :2),  $Y_1KKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :3) et  $Y_1KKKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :4), dans lesquelles  $Y_0$  est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et  $Y_1$  représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés.

10 2°) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide d'internalisation et d'adressage répond à la séquence  $X_1X_2X_3X_4X_5X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$ , dans laquelle  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}$  représentent chacun un acide  $\alpha$ -aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et  $X_6$  représentant un tryptophane.

15 3°) Peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce que la séquence  $Y_1$  correspond à la séquence KQIKIWTFQNRRMKWKK (SEQ ID NO :5).

20 4°) Utilisation d'un peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

25 5°) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre)  $Y_1KQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :2),  $Y_1KKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :3) et  $Y_1KKKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :4), dans lesquelles  $Y_0$  est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et  $Y_1$  est nul ou représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés.

30 6°) Utilisation selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisée en ce que ledit peptide d'internalisation répond à la séquence  $X_1X_2X_3X_4X_5X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$ , dans laquelle  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}$  représentent chacun un acide  $\alpha$ -aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et  $X_6$  représentant un tryptophane.

7°) Utilisation de cellules, dans lesquelles un peptide tel que défini à la revendication 4, 5 ou 6, a été internalisé, pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

8°) Procédé de criblage et de sélection de produits aptes à inhiber  
5 l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'inhibiteur potentiel avec une cellule dans laquelle un peptide tel que défini à la revendication 4, 5 ou 6, a été internalisé et

- la mesure du clivage de l'ADN ou de l'actine.

9°) Utilisation d'un peptide tel que défini tel que défini à la revendi-  
10 cation 4, 5 ou 6, pour la préparation d'un médicament anti-cancéreux.

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS

<120> NOUVELLES APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE  
CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOIDE.

&lt;130&gt; BLOcp644FR45

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp  
1 5 10 15Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn  
20 25 30Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Glu Gln Met Gln Asn  
35 40 45

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Y1 Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0  
1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Y1 Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0  
1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Y1 Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0  
1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys  
1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr  
1 5

VVEVD et Y<sub>1</sub> représente un peptide d'internalisation et d'adressage issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés et répond de préférence à la séquence X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>, dans laquelle X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent chacun un acide α-aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X<sub>6</sub> représentant un tryptophane.

Parmi les séquences Y<sub>1</sub> préférées, on peut citer la séquence KQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:5).

Les peptides X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub> ont notamment été décrits dans la Demande Internationale WO 97/12912.

Les peptides selon l'invention provoquent l'apoptose des cellules dans lesquelles ils sont internalisés et peuvent avantageusement être utilisés pour sélectionner et cribler des produits aptes à inhiber l'apoptose cellulaire.

La présente invention a donc également pour objet l'utilisation d'un peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (βAPP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

Conformément à ladite utilisation, ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre) Y<sub>1</sub>KQYTSIHGY<sub>0</sub> (SEQ ID NO:2), Y<sub>1</sub>KKQYTSIHGY<sub>0</sub> (SEQ ID NO:3) et Y<sub>1</sub>KKKQYTSIHGY<sub>0</sub> (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y<sub>0</sub> est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y<sub>1</sub> est nul ou représente un peptide d'internalisation et d'adressage issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés et répond de préférence à la séquence X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>, dans laquelle X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub> représentent chacun un acide α-aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X<sub>6</sub> représentant un tryptophane.

Le peptide de SEQ ID NO:2 dans laquelle Y<sub>1</sub> est nul et Y<sub>0</sub> est nul est dénommé peptide G (voir également figure 1).

La présente invention a également pour objet l'utilisation de cellules, dans lesquelles un peptide tel que défini ci-dessus a été internalisé, pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

REVENDICATIONS

1°) Peptides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des séquences incluant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP) (code une lettre), sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences  $Y_1KQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :2),  $Y_1KKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :3) et  $Y_1KKKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :4), dans lesquelles  $Y_0$  est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et  $Y_1$  représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés.

2°) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide d'internalisation et d'adressage répond à la séquence  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$ , dans laquelle  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}$  représentent chacun un acide  $\alpha$ -aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et  $X_6$  représentant un tryptophane.

3°) Peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce que la séquence  $Y_1$  correspond à la séquence KQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO :5).

4°) Utilisation d'un peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde ( $\beta$ APP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

5°) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre)  $Y_1KQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :2),  $Y_1KKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :3) et  $Y_1KKKQYTSIHHGY_0$  (SEQ ID NO :4), dans lesquelles  $Y_0$  est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et  $Y_1$  est nul ou représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3<sup>ème</sup> hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés.

6°) Utilisation selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisée en ce que ledit peptide d'internalisation répond à la séquence  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$ , dans laquelle  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}$  représentent chacun un acide  $\alpha$ -aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et  $X_6$  représentant un tryptophane.

7°) Utilisation de cellules, dans lesquelles un peptide tel que défini à la revendication 4, 5 ou 6, a été internalisé, pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

8°) Procédé de criblage et de sélection de produits aptes à inhiber  
5 l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'inhibiteur potentiel avec une cellule dans laquelle un peptide tel que défini à la revendication 4, 5 ou 6, a été internalisé et

- la mesure du clivage de l'ADN ou de l'actine.

9°) Utilisation d'un peptide tel que défini à la revendication 4, 5 ou  
10 6, pour la préparation d'un médicament anti-cancéreux.

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS

<120> NOUVELLES APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE  
CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOIDE.

&lt;130&gt; BLOcp644FR45

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp  
1 5 10 15Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn  
20 25 30Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Glu Gln Met Gln Asn  
35 40 45

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Y1 Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0  
1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Y1 Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0  
1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4  
Y1 Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0  
1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys  
1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

FEUILLE RECTIFIÉE

3

Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr  
1                   5

KKKQYTSIHHGVVEVDAAVTPEERHLSKMQQQNGYENPTYKPPEQMQN

G

E

H

FIGURE 1

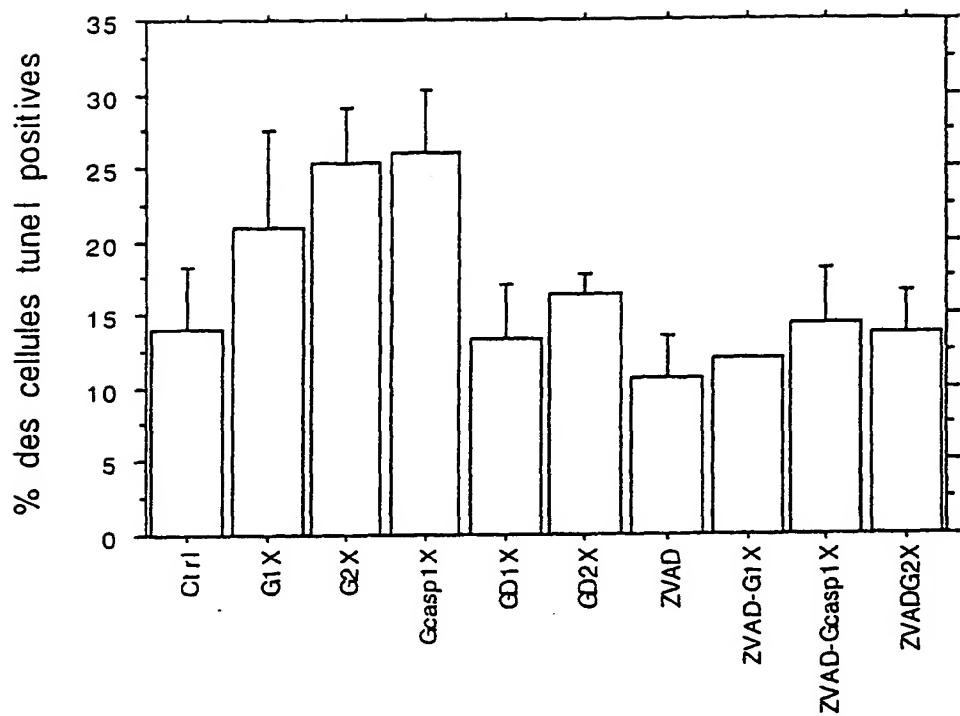


FIGURE 2

3/4

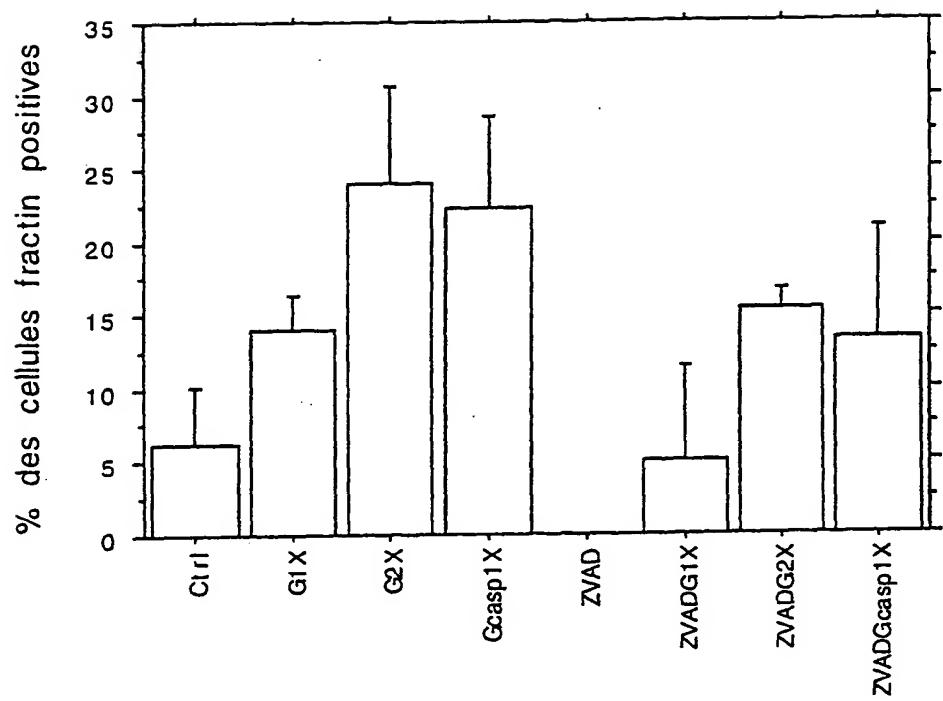


FIGURE 3

4/4

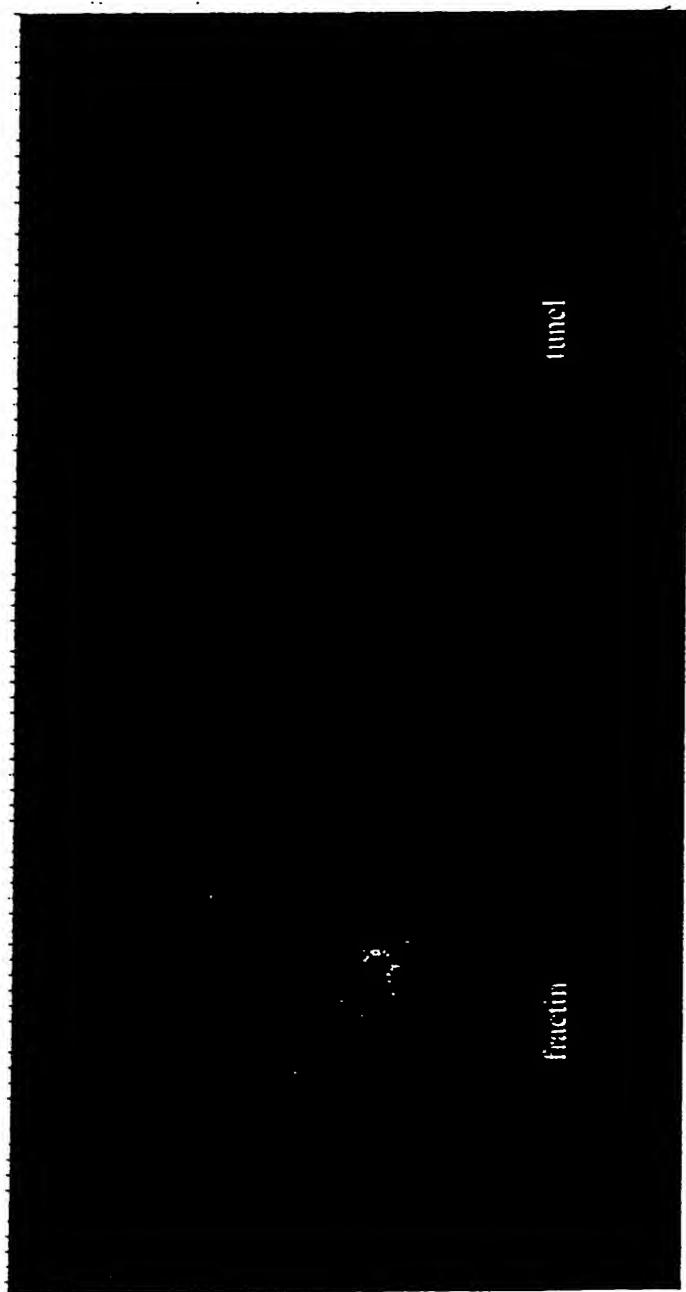


FIGURE 4



